

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2 0 0 4 年 5 月 2 6 日

出 願 番 号

Application Number:

特 願 2 0 0 4 - 1 5 6 0 9 8

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 5 6 0 9 8

出 願 人

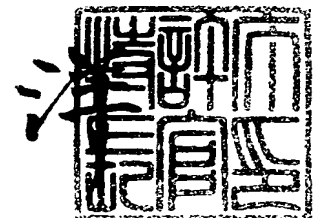
Applicant(s):

ヤマハ発動機株式会社

2 0 0 5 年 5 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【官 公 民 人】	付 託 期
【整理番号】	PY51695JP0
【提出日】	平成16年 5月26日
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	C12M 1/00
【発明者】	
【住所又は居所】	静岡県磐田市新貝2500番地 ヤマハ発動機株式会社内
【氏名】	張 凱
【特許出願人】	
【識別番号】	000010076
【氏名又は名称】	ヤマハ発動機株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100066980
【弁理士】	
【氏名又は名称】	森 哲也
【選任した代理人】	
【識別番号】	100075579
【弁理士】	
【氏名又は名称】	内藤 嘉昭
【選任した代理人】	
【識別番号】	100103850
【弁理士】	
【氏名又は名称】	崔 秀▲てつ▼
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	001638
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1
【包括委任状番号】	9911475

【請求項 1】

キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、

シスト化した前記光合成微生物を培地に接種する接種工程と、前記シスト化した光合成微生物を増殖させる増殖工程と、前記増殖した光合成微生物にキサントフィルを生成させる生成工程と、を備えることを特徴とするキサントフィルの製造方法。

【請求項 2】

前記接種工程から前記生成工程までを、同一の容器内で行うことを特徴とする請求項 1 に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 3】

前記増殖工程から前記生成工程までを、回分培養で行うことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 4】

前記回分培養は低栄養の培地を用いて行い、

前記生成工程において栄養欠乏により前記増殖した光合成微生物をシスト化させることで、キサントフィルを生成させることを特徴とする請求項 3 に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 5】

キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、

キサントフィルを内部に含有した前記光合成微生物を培地に接種し培養することで、キサントフィルを生成させることを特徴とするキサントフィルの製造方法。

【請求項 6】

前記キサントフィルの光合成微生物中の含有率は、前記培養開始直後から所定期間は減少し、その後増加することを特徴とする請求項 5 に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 7】

キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、

前記培養される光合成微生物のクロロフィル含有率は、前記培養開始直後から所定期間は増加し、その後減少傾向に転じ、

前記クロロフィル含有率が減少傾向にある時にキサントフィルを回収することを特徴とするキサントフィルの製造方法。

【請求項 8】

キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、

培地に接種された前記光合成微生物の増殖と、前記増殖した光合成微生物によるキサントフィルの生成と、が前記培地内で並行して進行するようにしたことを特徴とするキサントフィルの製造方法。

【請求項 9】

前記光合成微生物の培養を密閉容器内で行うことを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 10】

前記光合成微生物として、ヘマトコッカスを用いることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 11】

前記キサントフィルは、アスタキサンチンであることを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のキサントフィルの製造方法。

【請求項 12】

キサントフィルを含有した遊走子を細胞内に備えたことを特徴とする光合成微生物。

【発明の名称】 キサントフィルの製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明はキサントフィルの製造方法及び光合成微生物に関し、特に雑菌混入のおそれ少なく、効率的なキサントフィルの製造方法及び光合成微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

カロチノイドの一種であるキサントフィル（アスタキサンチン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニルビン、アドニキサンチン、 β -クリプトキサンチン等）には、有用性を有するものが多く存在する。例えば、赤色のカロチノイド色素であるアスタキサンチンは、脂質に対し強力な抗酸化作用があり、食材用色素、化粧品、医薬品や健康食品等に应用できることが知られている。アスタキサンチンは、化学合成されるもののほか天然物由来のものもあり、例えば天然物由来のものとしては、オキアミ・アマエビ類やファフィア酵母から抽出されるものがある。また、微細藻類であるヘマトコッカスから抽出することもでき、ヘマトコッカスを用いてアスタキサンチンを製造する方法として非特許文献1及び2、特許文献1に示すようなものがある。

【0003】

非特許文献1には、ヘマトコッカスを用いたアスタキサンチンの製造方法として、ヘマトコッカスを2段階培養する方法が示されている。すなわち、1段階目ではヘマトコッカスの栄養細胞（vegetative cell）について半回分培養（1日10%～40%の培養液を新しい培養液と交換する）を行い、2段階目では強い光を照射しながら15日間の回分培養を行うことで、栄養細胞の休眠細胞への移行と細胞内部へのアスタキサンチンの蓄積を誘発する。

【0004】

非特許文献2においても同様に、アスタキサンチンの商業的生産のための2段階培養方法が示されている。この方法においては、1段階目では密閉された光バイオリアクターで栄養細胞を培養し、2段階目では屋外培養池で、培地中の窒素とリンを欠乏させると共に温度上昇及び照射光の増加を行い、あるいは、培地に塩化ナトリウムを添加した状態で培養することで、休眠細胞となったヘマトコッカスのアスタキサンチン生成を誘発している。

【0005】

特許文献1においても同様に、1段階目は閉鎖型培養装置で栄養細胞の培養を行うと共に、2段階目は屋外培養池で休眠細胞へ移行させることでアスタキサンチンの生成、蓄積を誘発する2段階培養法が示されている。この方法においては、屋外培養池での培養時には、ヘマトコッカスを捕食或いは寄生する生物が屋外培養池に増殖する前に培養を完了することで、回収時の夾雑物の低減を図っている。

【特許文献1】 特開2000-60532号公報

【非特許文献1】 Jaime Fabregas, 他3名, "Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis", Journal of Biotechnology, 2001, Vol. 89, p. 65-71

【非特許文献2】 R. Todd Lorenz, 他1名, "Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin", TIBTECH, April 2000, Vol. 18, p. 160-167

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上述のように、マトコッカスへを用いたノボグリンゲンの製造方法においては、不食細胞の増殖工程と、この栄養細胞をシスト化することでアスタキサンチンを生成、蓄積させる生成工程と、を分けて、それぞれの段階に適した条件の培養を行うことで、生産性の増大を図っている。また、非特許文献2や特許文献1に示すようなレースウェイ式大気開放型培養池等の開放又は屋外培養池で2段階目の培養を行う場合には、培地に雑菌が増殖するまでの短期間に休眠細胞を収穫するために、あらかじめ増殖工程で栄養細胞を増殖させて大量の栄養細胞を準備する必要がある。

【0007】

しかしながら、2段階培養を行う場合には、1段階目及び2段階目のそれぞれの培地にマトコッカスの栄養細胞等を接種する必要がある、手間を要するだけでなく、接種する際に雑菌が混入する可能性がある。これは、非特許文献1のように増殖工程で半回分培養や連続培養を行う場合も同様である。

【0008】

また、2段階培養を行う場合には、1段階目の培地からマトコッカスのみを回収して1段階目とは異なる2段階目の培地へ切り替える必要がある、2つの異なる組成の培養を管理する必要がある。さらに2つの異なる組成を含んだ培地をそれぞれリサイクル工程及び残液処理工程に付すために、複数のリサイクル及び残液処理設備を持ち、河川等の富栄養の原因となる栄養分を除去しなければならなかった。

本発明は上述の問題点に鑑みてなされたものであり、各工程に要する手間及びこれに伴う雑菌混入のおそれが少なくかつ効率的なキサントフィルの製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の請求項1によるキサントフィルの製造方法は、キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、シスト化した前記光合成微生物を培地に接種する接種工程と、前記シスト化した光合成微生物を増殖させる増殖工程と、前記増殖した光合成微生物にキサントフィルを生成させる生成工程と、を備えることを特徴とする。

ここで、シスト化した光合成微生物とは、完全にシスト化し、休眠状態にある光合成微生物のみでなく、シスト化しつつある光合成微生物も含む。接種する光合成微生物としては、シスト化過程で生成したキサントフィルを細胞内の一部に含有した程度のものを用いることが好ましい。

【0010】

このように、シスト化してあらかじめキサントフィルを含有する光合成微生物を培養すると、増殖した光合成微生物もキサントフィルを含有するので、同一の時間の生成工程を経た後に光合成微生物に蓄積されるキサントフィルの含有量は多くなり、また最終的なキサントフィルの含有量も多くなるので、キサントフィルの収量が多い。また、シスト化した光合成微生物は、栄養条件下におかれると4、8、又は16個等の遊走子を放出することから培養開始後短期間に細胞数が飛躍的に増大するので、従来のように増殖速度が遅い光合成微生物を栄養細胞から培養する場合に比べて、増殖工程を短縮化することができる。

【0011】

本発明の請求項2によるキサントフィルの製造方法は、請求項1において、前記接種工程から前記生成工程までを、同一の容器内で行うことを特徴とする。

このことにより、別の容器へ移し替える時の雑菌混入防止や容器の洗浄工程削減、さらには移し替えの手間を省くことができる。

本発明の請求項3によるキサントフィルの製造方法は、請求項1又は2において、前記増殖工程から前記生成工程までを、回分培養で行うことを特徴とする。

培地の切り替えが不要な回分培養とすることで、接種工程や培地からの栄養分の除去工程を省き工程数を軽減し全工程に要する時間を短縮すると共に、接種工程に伴う雑菌の混入を防止することができる。

本発明の請求項4によるキサントフィルの製造方法は、請求項3において、前記回分培養は低栄養の培地を用いて行い、前記生成工程において栄養欠乏により前記増殖した光合成微生物をシスト化させることで、キサントフィルを生成させることを特徴とする。

このように、低栄養分の培地を用いて回分培養を行うと、栄養欠乏によるシスト化を誘発しやすいので好ましい。特に、シスト化した光合成微生物を増殖させた場合には、増殖速度が飛躍的に大きい遊走子放出期間の経過後直ぐに増殖した光合成微生物がシスト化されるような条件にすることで、短期間で効率的にキサントフィルを生成させることができる。

低栄養分の培地を構成するにあたっては、栄養塩量を調整して培地のN/P値（窒素のモル数/リンのモル数）が、シスト化した光合成微生物の組成と略同等、すなわち10～30程度とすることが好ましく、20程度とすることがさらに好ましい。

【 0 0 1 3 】

本発明の請求項5によるキサントフィルの製造方法は、キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、キサントフィルを内部に含有した前記光合成微生物を培地に接種し培養することで、キサントフィルを生成させることを特徴とする。

【 0 0 1 4 】

光合成微生物がキサントフィルを内部に含有していることは、以前に休眠状態にあった履歴を示す。キサントフィルを内部に含有した光合成微生物を接種することによって、増殖した光合成微生物もキサントフィルを含有するので、同一の時間の生成工程を経た後に光合成微生物に蓄積されるキサントフィルの含有量が多くなり、最終的なキサントフィルの含有量も多くなるので、キサントフィルの収量が多くなる。また、キサントフィルを内部に含有した光合成微生物を接種することにより培養工程の起点とするため、前記光合成微生物が栄養条件下におかれると4, 8, 16個等のキサントフィルを含有した遊走子を放出することから培養開始後の増殖速度が大きくなるので、培養工程を短縮することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の請求項6によるキサントフィルの製造方法は、請求項5において、前記キサントフィルの光合成微生物中の含有率は、前記培養開始直後から所定期間は減少し、その後増加することを特徴とする。

ここで、キサントフィルの光合成微生物中の含有率（以下、「キサントフィル含有率」と記すこともある。）とは、光合成微生物が含有するキサントフィル質量と光合成微生物の質量との比率を意味する。

【 0 0 1 6 】

キサントフィルは、栄養欠乏時に存在し、キサントフィル含有率は栄養欠乏状態が続くと増加する。そこで、あらかじめキサントフィル含有率が高い状態の光合成微生物を栄養分を含む培地へ接種することにより、培養開始後光合成微生物は増殖速度を大きく保ちながら増殖しかつ成長する。その後、培地の栄養が消費され、栄養欠乏になってしまうので、光合成微生物のキサントフィル含有率は増加する。これにより、栄養状態ではより増殖速度が大きく、栄養欠乏状態では光合成により成長しつつ、キサントフィルを生成するので、より早くキサントフィル量を増加させることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明の請求項7によるキサントフィルの製造方法は、キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、前記培養される光合成微生物のクロロフィル含有率は、前記培養開始直後から所定期間は増加し、その後減少傾向に転じ、前記クロロフィル含有率が減少傾向にある時にキサントフィルを回収することを特徴とする。

ここで、クロロフィル含有率とは、光合成微生物が含有するクロロフィル質量と光合成微生物の質量との比率を意味する。

クロロフィル含有率は、栄養欠乏時には減少する。そこで、あらかじめクロロフィル含有率が低い状態の光合成微生物を栄養分を含む培地へ接種することにより、培養開始後光合成微生物は増殖速度を大きく保ちながら増殖しかつ成長する。その後、培地の栄養が消費され、栄養欠乏状態になってしまうので、クロロフィル含有率が減少する。これにより、光合成微生物は栄養状態ではより増殖速度が大きく、栄養欠乏状態にも光合成により成長しつつ、キサントフィルを生成するので、より早くキサントフィルの量を増加させることができる。また、クロロフィル含有率が減少傾向にある時にキサントフィルを回収することで、キサントフィルを抽出する際に不要なクロロフィルの残量を低減できる。

【 0 0 1 9 】

本発明の請求項 8 によるキサントフィルの製造方法は、キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法であって、培地に接種された前記光合成微生物の増殖と、前記増殖した光合成微生物によるキサントフィルの生成と、が前記培地内で並行して進行するようにしたことを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

このことにより、増殖中にキサントフィルの生成が同時に進行できる環境を光合成微生物に与えるため、より早くキサントフィルを生成させることができる。また、栄養分を目標とする光合成微生物の増殖に必要な最小限の量だけ与えておくと、栄養欠乏によるシスト化誘起により増殖後のなるべく早い段階でキサントフィルの生成を開始するので、より早くキサントフィルを生成させることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の請求項 9 によるキサントフィルの製造方法は、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項において、前記光合成微生物の培養を密閉容器内で行うことを特徴とする。

このようにすれば、雑菌の混入を防止することができるので、より安全な製品を製造することができる。

本発明の請求項 1 0 によるキサントフィルの製造方法は、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項において、前記光合成微生物として、ヘマトコッカスを用いることを特徴とする。

ヘマトコッカスを用いれば、より生産性の高いキサントフィルの製造が可能になる。

本発明の請求項 1 1 によるキサントフィルの製造方法は、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項において、前記キサントフィルは、アスタキサンチンであることを特徴とする。

アスタキサンチンは、脂質に対する抗酸化性が特に高いので、健康食品や化粧品としての有用性が高い。

【 0 0 2 2 】

本発明の請求項 1 2 による光合成微生物は、キサントフィルを含有した遊走子を細胞内に備えたことを特徴とする。

キサントフィルを含有した遊走子を含有する光合成微生物は、増殖した光合成微生物もキサントフィルを含有するので、同一の時間の生成工程を経た後に光合成微生物に蓄積されるキサントフィルの含有量が多くなり、最終的なキサントフィルの含有量も多くなるので、キサントフィルの収量が多くなる。また、キサントフィルを内部に含有した光合成微生物を培養工程の起点に用いることにより、前記光合成微生物が栄養条件下におかれると 4, 8, 1 6 個等のキサントフィルを含有した遊走子を放出することから培養開始後の増殖速度が大きくなるので、キサントフィルの製造に必要な培養工程を短縮することができる。

【 0 0 2 3 】

前記光合成微生物の例としては、シスト化したヘマトコッカスが挙げられる。ヘマトコッカスを用いれば、より生産性の高いキサントフィルの製造が可能になる。

また、前記キサントフィルの例としては、アスタキサンチンが挙げられる。アスタキサンチンは、脂質に対する抗酸化性が特に高いので、健康食品や化粧品としての有用性が高い。

なお、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のキサントフィルの製造方法において、シスト化した前記光合成微生物を培地に接種して前記培養を行うことで、前記シスト化した光合成微生物を増殖させ、前記増殖した光合成微生物にキサントフィルを生成させることが好ましい。

さらに、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のキサントフィルの製造方法において、前記培養は低栄養の培地を用いて行い、前記培地の栄養欠乏により前記光合成微生物をシスト化させることで、キサントフィルを生成させることが好ましい。

【 0 0 2 5 】

また、請求項 8 に記載のキサントフィルの製造方法において、前記培養はシスト化された光合成微生物と略同様の N/P 値の培地を用いて行うことが好ましい。

さらに、請求項 8 に記載のキサントフィルの製造方法において、前記培養は、シスト化した前記光合成微生物を培地に接種して開始することが好ましい。

また、請求項 1 ～ 11 に記載のキサントフィルの製造方法に用いられる光合成微生物用培地であって、N/P 値が、シスト化した光合成微生物の組成と略同等であることが好ましい。

【発明の効果】

【 0 0 2 6 】

本発明によれば、雑菌の混入のおそれが少なく、かつ、短期間で効率的にキサントフィルを製造可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 7 】

次に、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。

図 1 ～ 図 4 は、各工程における光合成微生物（ヘマトコッカス）を撮影した写真であり、図 5 は本実施形態におけるキサントフィルの製造方法の流れを示すフローチャートである。

図 5 のフローチャートを用いて本実施形態のキサントフィルの製造方法の流れについて説明する。

【 0 0 2 8 】

まず、接種工程 S 1 1 において、シスト化した光合成微生物を培地に接種する。接種する光合成微生物は、図 1 に示すようにシスト化され、キサントフィル、特に赤色のアスタキサンチンを例えば細胞中に約 1.2 % 含有して赤みを帯びたものである。このような光合成微生物は、例えば、接種工程 S 1 1 において栄養細胞を所定条件で培養し、シスト化することで得ても良いし、後述する生成工程 S 1 3 においてシスト化した光合成微生物の一部を用いても良い。

【 0 0 2 9 】

次に、接種工程 S 1 1 において接種された光合成微生物を栄養分を含んだ培地内で増殖させる（増殖工程 S 1 2）。この増殖工程 S 1 2 においては、図 2 に示すようにシスト化した光合成微生物から、アスタキサンチンを例えば約 1 % 含有し、赤色を帯びた 4, 8, 或いは、16 個の遊走子が放出される。このため、栄養細胞を培地に接種し、栄養条件下で 2 つに細胞分裂させるときよりも、短時間で光合成微生物数が飛躍的に増大する。放出された遊走子は、栄養分が存在する条件下で成長して栄養細胞となる。初期の培地における栄養成分の濃度に応じてこの増殖工程 S 1 2 の期間の長さは決まり、その際細胞分裂等により増殖する。

【 0 0 3 0 】

それに続いて、増殖工程 S 1 2 において増殖した光合成微生物のシスト化を誘発することで、増殖した光合成微生物にキサントフィルを生成させる（生成工程 S 1 3）。この生成工程 S 1 3 においては、例えば、栄養欠乏、高温、照射光の増加、塩化ナトリウムの添加、又はこれらを組み合わせた条件下に、光合成微生物をおくことでシスト化を誘発させる。これにより、図 3（生成工程 S 1 3 の中間時点付近の光合成微生物）及び図 4（生成工

仕上りの終了時点付近の細胞生成速度が低下し、シスト化が進むにつれ、徐々に細胞が肥大化するとともに、内部に蓄積されるキサントフィルの量が増大して赤みが増す。

【0031】

なお、生成工程S13は、増殖工程S12の途中から始まり、同時にオーバーラップして進行する。

回収工程S14においては、培地を回収し、生成工程S13を経て内部にキサントフィルが生成、蓄積された光合成微生物を回収する。その後は、公知の方法を用いて光合成微生物から目的のキサントフィルを抽出する。

回収された光合成微生物（或いは培地）の一部を再び増殖工程S12～生成工程S13におくことで、接種工程S11においてシスト化した光合成微生物を準備する手間を省くことができる。このとき、回収した培地や光合成微生物を新たな培地に接種しても良いが、回収工程S14において培地の全部を回収することなく一部を残したままとし、これに新たな培地を追加して、増殖工程S12を開始させると工程が容易になる。

【0032】

このように、シスト化した光合成微生物を培地に接種して増殖させると、増殖工程S12の開始時にシスト化した光合成微生物があらかじめキサントフィルを含有しているので、生成工程S13を経たあとの最終的なキサントフィルの含有量も多くなり、キサントフィルの収量が大きい。さらに、培養開始から短時間に光合成微生物が大量に増殖するので、増殖工程S12を短縮化できる。

【0033】

なお、増殖工程S12から生成工程S13への移行時に培地を切り替えたり、培養条件を変えたり、別の培養容器へ移し替えても良く、これらの場合にもシスト化した光合成微生物を増殖工程の開始に用いることによる効果を得ることができる。しかし、増殖工程S12から生成工程S13への移行時には、接種工程S11で光合成微生物が接種された培地を追肥や入れ替えを行うことなくそのまま用いて、同一の密閉容器内で回分培養を行い、増殖工程S12及び生成工程S13を連続的に行うことが望ましい。すなわち、増殖工程S12における栄養分の消費によって栄養欠乏状態になり、これにより生成工程S13に移行して光合成微生物のシスト化を誘発する。

【0034】

このような培養を行うことで、増殖工程S12から生成工程S13へ移行するための接種工程や培地の切り替えによる栄養物の除去工程等を省いて、工程数を軽減することができる。また、接種工程が不要であると培養容器も密閉した構成にしやすいので、設備の面からも雑菌の混入防止が可能である。

【0035】

これと共に、多数回の細胞分裂を行わせて増殖工程S12が長期化すると光合成微生物からの排出物により培地が汚染され、生成工程S13において光合成微生物の死滅量が多くなるが、前述のように増殖工程S12に要する期間を短時間とすることができるので、光合成微生物の死滅を抑制して生成工程S13を効率的なものとすることができる。

前記回分培養を行うときは、低栄養の培地を用いると栄養欠乏によるシスト化を誘発しやすいので好ましい。このとき、通常の光合成微生物用培地よりもNを含む栄養塩を減量して、培地のN/P値がシスト化された細胞とほぼ同様のものを用いれば、シスト化をより早く誘発することができる。また、増殖とシスト化とを並行して進行させることができるので好ましい。

【0036】

その他の培養条件（培養温度、CO₂の供給、光照射条件等）については、回分培養の間同一としても良いし、工程の進度に応じて変更しても良い。

なお、用いることができる光合成微生物としては、*Haematococcus pluvialis*（国立環境研究所のNIES144、米国テキサス大学藻類保存施設のU

HEALTHY CULTURE COLLECTIONのATCC 30402、同30453、東京大学応用微生物研究所のIAM C-392、同C-393、同C-394、同C-339、UTEX 16、同294等）、*H. capensis*（UTEX LB1023等）、*H. droebakensis*（UTEX 55等）、*H. zimbabwiensis*（UTEX LB1758等）等の単細胞藻類のヘマトコッカス（緑藻綱ボルボックス目クラミドモナス科ヘマトコッカス属）等が挙げられる。

【0037】

また、培養容器は、密閉容器であることが好ましく、例えばタンク型、チューブラー型、エアドーム型、平板型又は中空円筒型等種々の培養装置を用いることができる。高圧蒸気滅菌できるタンク型培養装置は、光合成微生物を純粋培養することができるので、この目的に好適である。

また、これらの藻類用の培地としては、増殖に必要な窒素、リン、カリウム、マグネシウム、鉄、その他微量金属の無機塩とチアミン等のビタミンを含むものが用いられ、例えばVT培地、C培地、MC培地、MBM培地、MDM培地（藻類研究法、千原光雄・西澤一俊編、共立出版、1979）、OHM培地（J. Fabregas他、"Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from Haematococcus pluvialis", Journal of Biotechnology, 2001, Vol. 89, p. 66）、BG-11培地（CRC Handbook of Microalgal Mass Culture, Amos Richmond, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1986, p127）、及びこれらの改変培地等が挙げられる。

【実施例1】

【0038】

次に、本発明の実施例について説明する。

【キサントフィルの製造について】

以下、キサントフィルを製造するために行ったヘマトコッカスの培養について説明する。

（1）培養手順について

まず、接種工程S11において、後の増殖工程S12に供する種細胞を培養した。種細胞は、ヘマトコッカス・ブルピウス K0084（Scandinavian Culture Center for Algae and Protozoa, Botanical Institute, University of Copenhagen, Denmark）を接種して、5日間培養し、目視により茶色の細胞を選別することで得た。この詳細な培養条件（光照射、接種濃度、培地条件）は、後述の通りである。そして、この種細胞を、上述と同様の本培養用の培地に接種した。

【0039】

次に、接種工程S11において培地に接種された種細胞を培養する（本培養）ことで、増殖工程S12と生成工程S13とを並行して行った。詳細な培養条件（光照射、接種濃度、培養温度）は、種細胞の培養とほぼ同様であり、後述する。なお、この本培養では追肥を行わず、増殖とシスト化を同一の容器で行った。なお、追肥を行わなかった理由は、最初に与えられた培地の栄養のみで増殖が進行しながら、シスト化した細胞内にキサントフィルを生成するという現象が同一の容器内で並行して起こるか否かを確認するためである。培養時間は本培養培地への接種を開始時点として、開始時点から約350時間とした。培養は、細胞内のキサントフィル含有率が大きく増加しなくなった時点で終了し、この時点を終了時点とした。

【0040】

（2）培養条件について

接種濃度：密閉式扁平培養瓶（容積0.0015m³、ライトパス25mm）に0.00

1 ml の培地を入れ、細胞吸込が 0.15 ml になるように培地に接種し、培養した。

培養温度：25℃（約15℃～30℃の範囲にすることが好ましい。）

CO₂の供給条件：増殖に十分なCO₂の供給と光照射を均一にするための攪拌を目的として、3体積%のCO₂を含むガスを通気量0.6 L/minで培地に供給した。

光照射条件：光源として白色蛍光灯（National製、FL40SSW/37）を用いた。LICOR-190SA平面光量子センサー（LICOR Inc., Lincoln, USA）を使って培養瓶受光方向の光合成有効光量子束密度（PPFD）を測定し、培養瓶位置のPPFDが100 μmol/m²sとなるようにした。（なお、光照射の強度を大きくすることにより、キサントフィルの生成が促進される。）

培地条件：硝酸ナトリウムを窒素塩成分としたBG-11をベースに、窒素塩成分を硝酸カリウムに変更し、硝酸カリウム濃度を0.41 g/lにした改変BG-11を使った。この硝酸カリウム濃度は、培地中のN/P値がシスト化した細胞の組成と略同様の20程度となるように、決定した。なお、培養中、培地のpHは細胞の増殖に好ましい6～8の範囲に保たれていた。

【0041】

【測定条件について】

本培養中には、あらかじめ決めた時間に本培養の扁平培養瓶からサンプリングし、次の項目について測定を行った。

（1）細胞濃度の測定について

採取した細胞液（培地）をよくかき混ぜてから必要な量を取り、前処理したGC50ガラス繊維ろ紙（TOYO・ADVANTEC製）に乗せて減圧吸引を行い、ろ紙の上にたまった液層が無くなったら、細胞液中の無機塩沈殿類を溶かすためにpH4で調製しておいたHCl水溶液5 ml/回をろ紙の表面に均一に撒き、2回ほど軽く洗った。含有水分を完全に除去する為にろ紙ごと恒温乾燥器に入れて105℃で3時間乾燥を行なった。その後、乾燥したろ紙を真空デシケーターに入れて1時間以上置き、完全に室温になったところでろ紙の重さを分子天秤で測定した。そして、下記の式（1）のように、細胞採取前後のろ紙の重さの差によって細胞濃度（乾燥重量）を求めた。

細胞濃度（乾燥重量）（kg/m³）＝（乾燥後のろ紙の重さ－細胞採取前のろ紙の重さ）（kg）／細胞液の採取量（m³）・・・式（1）

【0042】

なお、前記ガラス繊維ろ紙の前処理は、次のようにして行った。まず、含有水分を完全に除去する為に、市販されているTOYO・ADVANTEC製GC50ガラス繊維ろ紙をガラスシャーレに入れ、恒温乾燥器に入れて105℃で1時間乾燥した後、真空デシケーターに入れて完全に室温まで下がる1時間以上置いた。その後、ろ紙の重さを測定・記録しておいた。

【0043】

次に、公知文献1（Boussiba & Vonschak, 1991, Plant Cell Physiology 32 (7), 1077～1082）及び公知文献2（Davis BH, 1976, Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2nd edition, VOL. 2, edited by Goldwin TW, pp 38～105, Academic Press, London）に記載の原理に基づいて、クロロフィル濃度とキサントフィル濃度の測定を行ったので、詳細に説明する。

【0044】

（2）クロロフィル濃度の測定について

採取した細胞液をよくかき混ぜてから5×10⁻⁶ m³を取り出して、茶色遠沈管に入れ、遠心分離（3500 rpm, 5分間）を行ない、沈殿した細胞を収穫した。その細胞を竹串で潰し、99.5%のジメチルスルホキシド（以下はDMSOと簡称、関東化学株式会社製特級）5×10⁻⁶ m³に分散させた後、30分間室温で遮光静置した。その後、70℃の恒温バスに入れて10分間湯浴した。細胞が完全に白くなるまで、必要に応じて上

記へのソノを林ヲ巡して行なつた。その夜、日中に集した細胞を含有する抽出液を遠心分離して（3500rpm, 5分間）上澄み液を採取した。そして、前記上澄み液を光路長が1cmのガラスセル（ソーダガラス板製）に入れ、672nmでの抽出液の吸光度を分光光度計（日立分光光度計U-3210）で測定した。前記分光光度計によるクロロフィル濃度は、前記公知文献の記載に基づいて、以下の式（2）で求めた。

【0045】

クロロフィル濃度（ g/m^3 ）= 13.9 × 稀釈倍率 × 吸光度・・・式（2）

また、細胞質量に対するクロロフィルの含有率（質量百分率）【%】は、次の式（3）で求めた。

クロロフィル含有率（%）= クロロフィル濃度（ g/m^3 ） / （乾燥重量（ kg/m^3 ） × 1000） × 100・・・式（3）

【0046】

（3）キサントフィル濃度の測定について

採取した細胞液をよくかき混ぜてから $5 \times 10^{-6} \text{m}^3$ を取り出して、茶色遠沈管に入れ、遠心分離（3500rpm, 5分間）を行ない、沈殿した細胞を収穫した。収穫した細胞を竹串でつつき細胞の固まりを軽く崩した後、キサントフィルの分光測定の際に妨害成分となるクロロフィルを破壊するために、KOHを30体積%のメタノール水溶液に溶解させた溶液（KOHの濃度は5質量%）を $5 \times 10^{-6} \text{m}^3$ 入れ、竹串で細胞を溶媒に分散させ、恒温水槽（70℃）で10分間湯浴した。その後、遠心分離（3500rpm, 5分間）して細胞の固まりを竹串で潰してから、室温の酢酸（和光純薬製特級99.7%純度）を1ml用パスツールピペットでとり4液滴加え、残留アルカリを中和した。その後、DMSOを5ml加えて、その後20分間遮光静置した。更に恒温水槽（70℃）に入れて10分間湯浴した。その後、遠心分離（3500rpm, 5分間）して上澄み液を回収し、492nmでの吸光度を分光光度計で測定した。分光光度計によるキサントフィル濃度は、前記公知文献1及び公知文献2の記載に基づいて、以下の式（4）で求めた。なお、ヘマトコッカス・ブルビアスが生成するキサントフィルはそのほとんどがアスタキサンチンであるため、本実施例ではアスタキサンチン濃度が測定されることになる。

【0047】

キサントフィル濃度（ g/m^3 ）= 4.5 × 稀釈倍率 × 吸光度・・・式（4）

また、細胞質量に対するキサントフィルの含有率（質量百分率）【%】は、次の式で求めた。

キサントフィル含有率（%）= キサントフィル濃度（ g/m^3 ） / （乾燥重量（ kg/m^3 ） × 1000） × 100・・・式（5）

【0048】

【培養結果について】

図6に、培養の結果をグラフで示す。

培養開始後、細胞濃度（乾燥重量）は培養時間の経過に伴って増加し、本培養条件下では350時間で約 $5 \text{kg}/\text{m}^3$ に達した（図6（A）のグラフ）。なお、同グラフの縦軸は、培地 0.001m^3 中の細胞の乾燥重量を表し、前記式（1）で求めた細胞濃度 [g/m^3] を1000倍した値である。

また、キサントフィル濃度は、培養時間が50時間までに僅かな増加傾向が見られ、50時間以降においては著しく増加したことが特徴であった（図6（B）のグラフ）。なお、同グラフの縦軸は、培地 0.001m^3 中に含有するキサントフィルの質量を表し、前記式（4）で求めたキサントフィル濃度 [g/m^3] を1000倍した値である。

【0049】

キサントフィル含有率は、培養時間が50時間までに激減した後、50時間を超えると徐々に増えてき、全培養過程における変化が谷状になっていることが特徴であった（図6（C）のグラフ）。

クロロフィル含有率は、培養時間が50時間までに激増して、50時間を超えると緩やかに低下していき、全培養過程における変化が山状になっていることが特徴であった（図

【0050】

これらの結果から、追肥を行わないため、最初に与えられた培地の栄養分による増殖と、栄養欠乏になるに従って誘発されたシスト化によるキサントフィルの生成とが、同一の密閉容器内で並行して起こることが確認された。

また、本培養開始時にキサントフィルを含有していても、キサントフィル濃度と細胞濃度がほぼ直線的に増加していることから、培養時間が同一ならばキサントフィルがより多く生成されることが推測される。

なお、キサントフィル含有率の谷状変化及びクロロフィル含有率の山状変化は、光合成有効光量子束密度、培地濃度及び接種濃度を前記培養条件と異なる条件とすることにより、減少から増加に転じる（増加から減少に転じる）時点が変わったり、各種の値が上下したりすることがあるが、谷状変化及び山状変化の特徴は変わりなかった。

【0051】

また、図1～図4は、本培養開始から各時間（0時間、50時間、200時間、350時間）経過後のヘマトコッカス・ブルビアスを撮影した写真である。前述のように、本培養開始時にはシスト化してキサントフィルを含有する細胞を接種する（図1）。50時間が経過すると、接種した細胞からキサントフィルを含有する新たな細胞（遊走子）が複数個放出され、さらにこの増殖した細胞の細胞壁の内側に蓄積したクロロフィル（緑色）が本培養開始時よりも増え、緑色が濃くなっているのが分かる（図2）。200時間が経過すると、増殖した細胞が大きくなって、細胞壁の内側に形成された緑輪（クロロフィル）のさらに内側に蓄積されたアスタキサンチンの量が増加しているのが分かる（図3）。350時間が経過した時点では、増殖した細胞が大きくなると共に、細胞壁の内側が赤色の内容物でほとんど占められているのが分かる（図4）。これらの経過は、上記グラフに示された経過と一致していることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】培地に接種するヘマトコッカスを撮影した写真である。

【図2】増殖するヘマトコッカスを撮影した写真である。

【図3】キサントフィルを生成したヘマトコッカスを撮影した写真である。

【図4】キサントフィルを生成した培養終了時点でのヘマトコッカスを撮影した写真である。

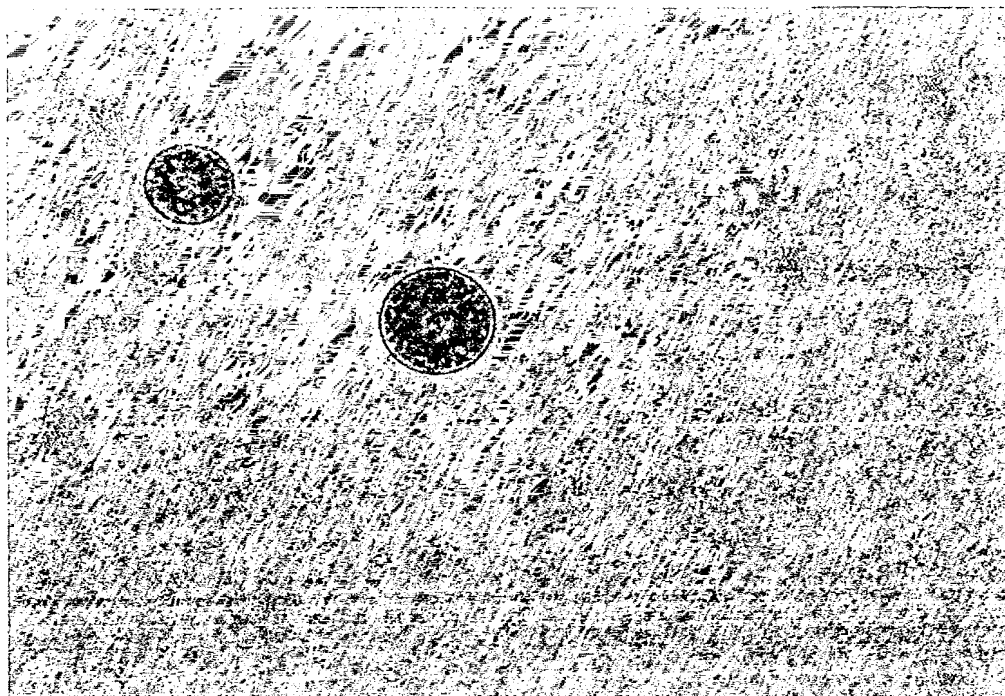
【図5】キサントフィルの製造手順を示したフローチャートである。

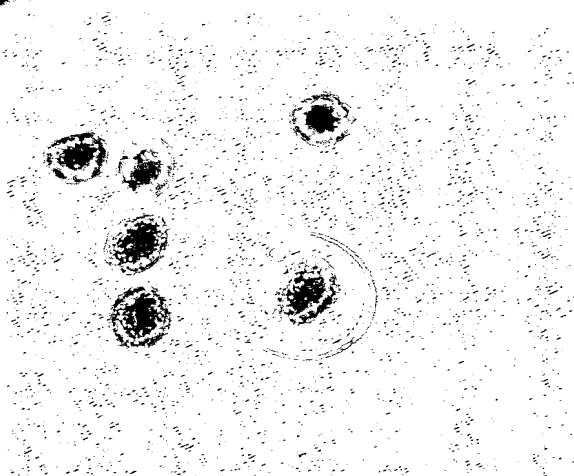
【図6】（A）は培養時間の変化に伴う細胞濃度の変化を示すグラフ、（B）は培養時間の変化に伴うキサントフィル濃度の変化を示すグラフ、（C）は培養時間の変化に伴うキサントフィル含有率の変化を示すグラフ、（D）は培養時間の変化に伴うクロロフィル含有率の変化を示すグラフである。

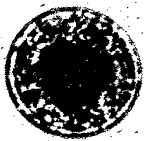
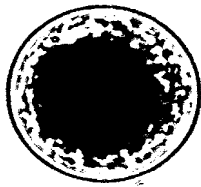
【符号の説明】

【0053】

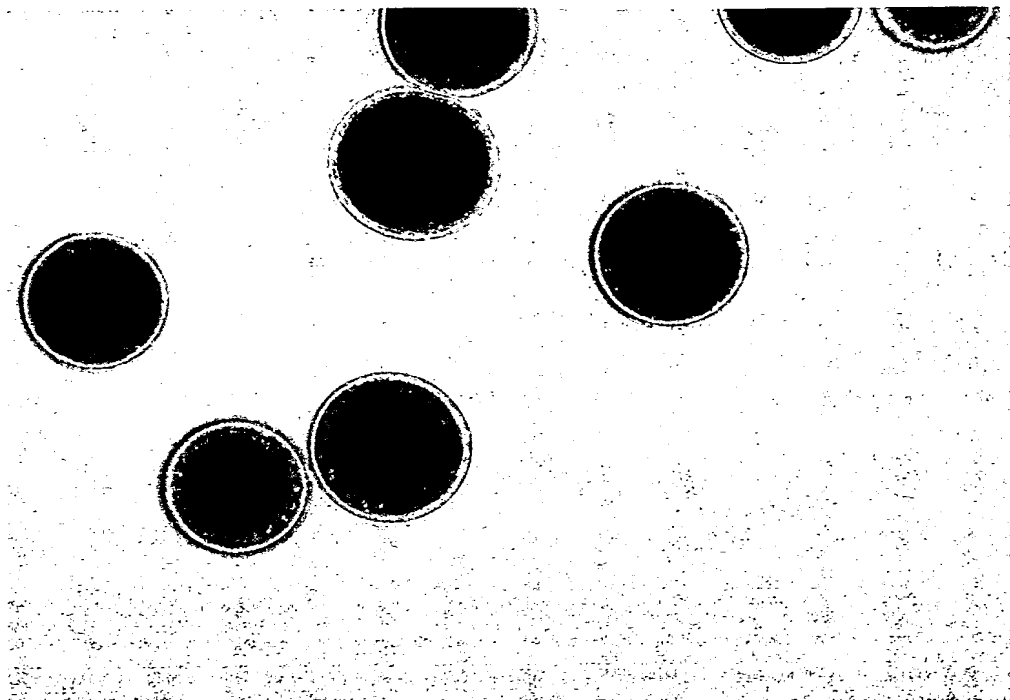
S 1 1	接種工程
S 1 2	増殖工程
S 1 3	生成工程
S 1 4	回収工程



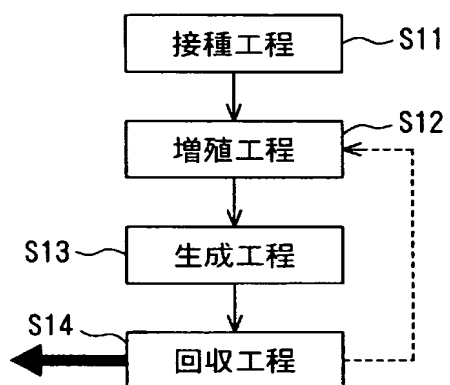


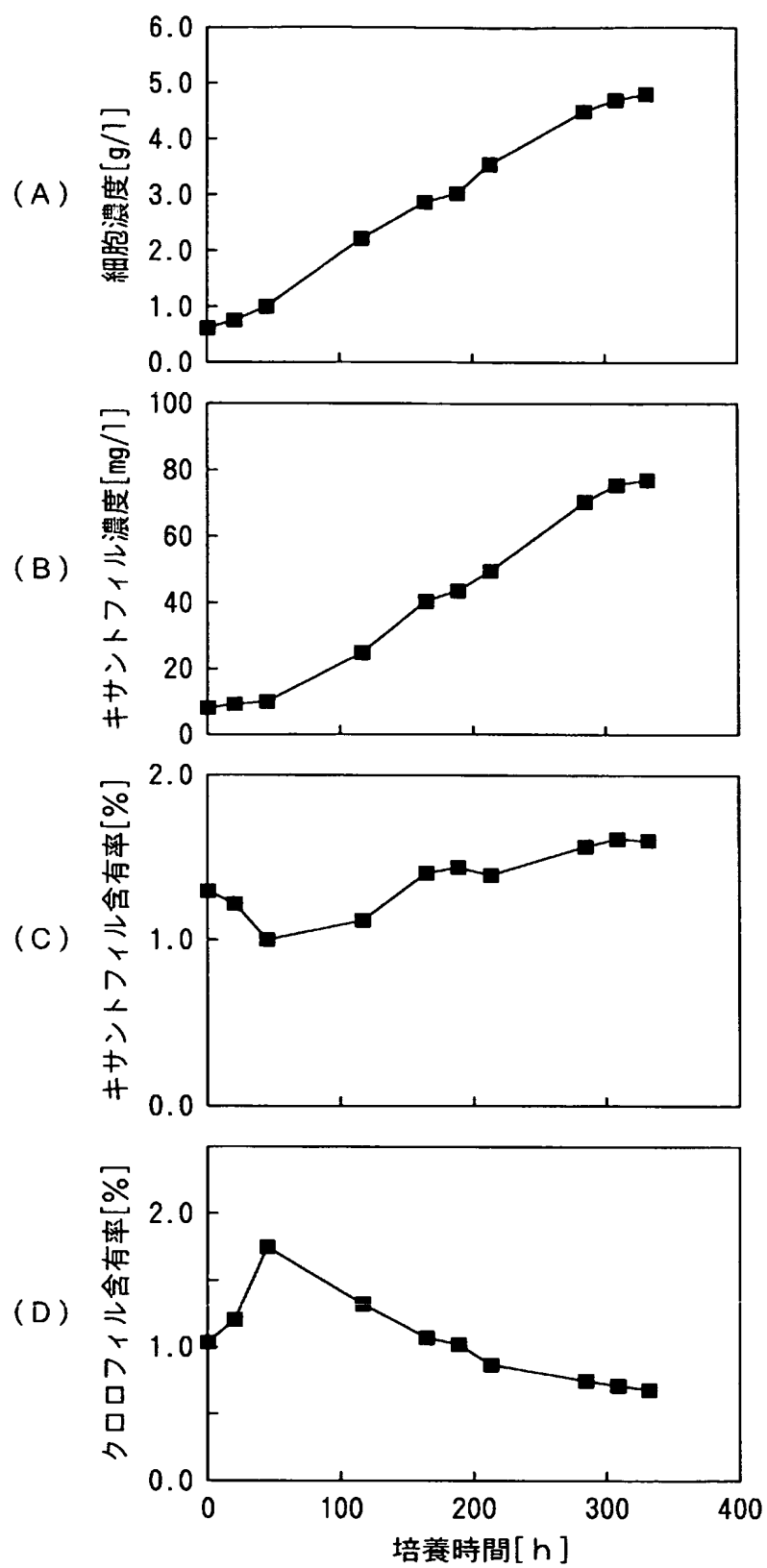


【図 4】



【図 5】





【要約】

【課題】 各工程に要する手間及びこれに伴う雑菌混入のおそれが少なくかつ効率的なキサントフィルの製造方法を提供する。

【解決手段】 キサントフィルを生成する光合成微生物を培養し、この光合成微生物によって生成されたキサントフィルを回収するキサントフィルの製造方法において、シスト化した光合成微生物を培地に接種し、このシスト化した光合成微生物を増殖させ、増殖した光合成微生物にキサントフィルを生成させる。

【選択図】 図 6

-

0 0 0 0 1 0 0 7 6

・ 19900829

新規登録

静岡県磐田市新貝 2 5 0 0 番地

ヤマハ発動機株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/008274

International filing date: 22 April 2005 (22.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-156098
Filing date: 26 May 2004 (26.05.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 02 June 2005 (02.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.